(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 8 月 1 日 (01.08.2013)

(10) 国際公開番号
WO 2013/111897 A1

(51) 国際特許分類：
A61K 45/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2013/051733

(22) 国際出願日： 2013 年 1 月 28 日 (28.01.2013)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2012-015982 2012 年 1 月 27 日 (27.01.2012) JP

(71) 出願人：国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者：石井 優 (ISHII, Masaru); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 賀川 義規 (KAGAWA, Yoshinori); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 森 正樹 (MORI, Masaki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 石井 秀始 (ISHII, Hideshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人：庄司 隆，外 (SHOJI, Takashi et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目6番13号 御幸ビル307号 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: NOVEL ANTITUMOR AGENT AND METHOD FOR SCREENING SAME

(54) 発明の名称：新規抗腫瘍剤及びそのスクリーニング方法

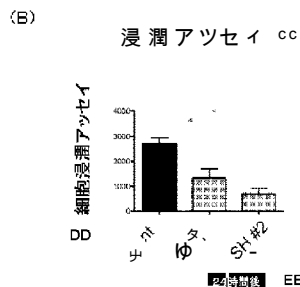
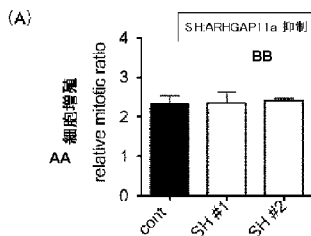



FIG. 7:
AA Cell proliferation
BB Inhibition of SH:ARHGAP11a
CC Invasion assay
DD Cell invasion assay
EE After 24 hours

(57) Abstract: The present invention provides a novel antitumor agent with a novel action mechanism. The novel antitumor agent comprises, as the active ingredient, a substance capable of inhibiting a cell cycle-dependent Rho GTPase activating protein (RhoGAP). The Rho GAP, which depends on the cell cycle, plays an important role in the course of the acquisition of metastatic ability and/or invasive ability by cancer cells. By targeting the RhoGAP, the invasion and/or metastasis of cancer cells can be controlled. As the substance capable of inhibiting the cell cycle-dependent RhoGAP, an antisense oligonucleotide against an RhoGAP-encoding gene, an oligonucleotide inducing RNA interference, etc. can be cited. An oligonucleotide containing a synthetic nucleic acid such as BNA is preferred because of the high stability thereof. The present invention also provides a screening method for selecting an antitumor agent which is capable of suppressing the invasion and/or metastasis of cancer cells by a novel mechanism. This method for screening a novel antitumor agent is characterized in that a substance capable of inhibiting a cell cycle-dependent Rho GTPase activating protein is selected thereby.

(57) 要約：本発明は、新規メカニズムにより作用する新規抗腫瘍剤を提供する。細胞周期依存性の RhoGTP 分解活性タンパク質 (Rho GTPase activating protein：RhoGAP) を阻害しうる物質を有効成分として含有する新規抗腫瘍剤による。RhoGAP は細胞周期依存性であり、がん細胞が浸潤能及び/又は転移能を獲得する過程で重要な役割を果たす。RhoGAP を標的とすることで、がん細胞の浸潤及び/又は転移を制御しうる。細胞周期依存性の RhoGAP を阻害しうる物質が、RhoGAP をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドや RNA 干渉を誘導するオリゴヌクレオチドなどが挙げられる。オリゴヌクレオチドには、BNA などの人工核酸を含むものが安定性に優れており、好ましい。本発明は、さらには、新規メカニズムによる、がん細胞の浸潤及び/又は転移を抑制しうる抗腫瘍剤を選別するスクリーニング方法を提供する。細胞周期依存性の RhoGTP 分解活性タンパク質を阻害しうる物質を選別することを特徴とする新規抗腫瘍剤のスクリーニング方法による。

WO 2013/111897 A1

明 細 書

発明の名称 :新規抗腫瘍剤及びそのスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞周期依存性タンパク質を標的とし、新規なメカニズムにより作用する新規抗腫瘍剤に関する。さらには、新規なメカニズムによるがん細胞の浸潤及び/ 又は転移を抑制しうる抗腫瘍剤を選別するスクリーニング方法に関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願２０１２_０１５９８２号優先権を請求する。

背景技術

[0003] 細胞は増殖する時に細胞周期と呼ばれる一定のプロセスを経る。すなわち、細胞はG1期 (gapl) →S期 (DNA synthes is) →G2期 (gap2) →M期 (mitos is) →G1期という順序で規則正しく細胞周期を繰り返して増殖してゆく。細胞周期の進行にとってひとつの重要な時期がG1期とS期の境目に存在する。その時期は哺乳動物培養細胞ではR点 (restriction point) と呼ばれる。一旦、R点を通過すると、細胞周期は進行するように方向づけられて速やかにS期に進入し、続けてG2期、M期へと進んでいってG1期へ戻ってくる。細胞が増殖しない環境にあるときは、S期に進まずにそのままG1期にとどまるか、あるいは細胞周期からはずれて静止期 (resting state; G0期) と呼ばれる特別な状態に入り休止状態となる。細胞の置かれた環境によっては、分化、老化、アポトーシス、減数分裂などへ進むべきシグナルを受け取ることもあるが、それらの状態への分岐点も現在のところはこのG1期のR点前に存在すると考えられている。

[0004] がん細胞は細胞周期制御が異常となり、周りの細胞から来る分裂停止のシグナルを無視して増殖を続けてゆく細胞である。がん細胞は際限なく増殖し、浸潤・転移によりやがて全身の臓器の機能不全をもたらし患者を死に至らしめる。これまで悪性腫瘍治療薬としては、旧来より使用されている抗悪性

腫瘍剤や、がん細胞特異的な増殖シグナルを抑制する分子標的薬剤など、いずれも増殖性の高いがん細胞を障害するものであった。また最近では、悪性腫瘍組織周囲の血管新生を抑制し、代謝の激しい悪性腫瘍組織への補給路を断つ治療もある。具体的には、乳がんに発現するHER2をターゲットにしたトラスツマブ、EGFR（上皮細胞増殖因子受容体）のキナーゼ活性を阻害するゲフィチニブ、CML（慢性骨髄性白血病）の染色体転座による、Bcr-Ab Lキメラ遺伝子のチロシンキナーゼ活性を阻害するメシル酸ィマチニプ、B細胞リンパ腫の特異的CD20抗原を認識するツキシマブ、AML（急性骨髄性白血病細胞）に発現する、細胞表面抗原CD33に対するモノクローナル抗体を含むリツキシマプ、EGFRのチロシンキナーゼ酵素を阻害するエルロチニプ、VEGF（血管内皮成長因子）に対する、モノクローナル抗体からなるバベシズマプ等が挙げられる。細胞周期進行に要するタンパク質を阻害してアポトーシスを誘導するボルテゾミプ(Bortezom ib)も用いられている。また、ワクチン治療など、宿主の抗腫瘍免疫を高める治療も進められている。

[0005] 一方で、悪性腫瘍で致死的状況となる際に最も重要な過程は、浸潤・転移である。特に、がん化した細胞が局所に発生しても、細胞の増殖には生体内では様々な構造的制限があるので、十分な浸潤能を有していなければ、がん細胞は局所にとどまり、増殖・進展ができない。がん細胞は原発巣から離脱し、タンパク質分解酵素を産生し周囲の間質や基底膜を破壊して脈管内に侵入する。次に脈管内を移動して標的臓器の血管内皮細胞へ接着し、血管内から組織中へ同様の機序で浸潤していく. そしてその場で増殖することにより転移巣を形成すると考えられている。近年、原発巣からの離脱と標的組織への接着、浸潤の過程には細胞接着分子と特殊なタンパク質分解酵素が大きな役割を果たしていると考えられている。

[0006] しかしながら、がん細胞の浸潤及び/又は転移を抑制する薬剤は十分とはいえず、さらなる開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1 :NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer bioLogy and therapeutics. Matsumoto K, Nakamura T. (2003) Cancer Science 94: 321-327.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、細胞周期依存性タンパク質を標的とし、新規メカニズムにより作用する新規抗腫瘍剤を提供することを課題とする。さらには、新規メカニズムによる、がん細胞の浸潤及び/又は転移を抑制しうる抗腫瘍剤を選別するスクリーニング方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、あるRhoGTP分解活性タンパク質（Rho GTPase activating protein :RhoGAP, 以下単に rRhoGAPj という場合もある。）が、細胞周期に依存した調節を受けており、これがん細胞が浸潤能（細胞可動性）を獲得する過程で重要な役割を果たすことを初めて見出した。当該RhoGAP を標的とすることで、がん細胞の可動性及び/又は転移を制御しうることを確認し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は以下よりなる。

1．細胞周期依存性のRhoGTP 分解活性タンパク質（RhoGAP)を阻害しうる物質を有効成分として含有する新規抗腫瘍剤。

2．細胞周期依存性のRhoGAP を阻害しうる物質が、ARHGAP 11A を阻害しうる物質である、前項1に記載の新規抗腫瘍剤。

3．ARHGAP 11A を阻害しうる物質が、ARHGAP 11A をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド又はRNA干渉を誘導するオリゴヌクレオチドであり、或いはARHGAP 11A をコードする遺伝子の転写産物若しくは翻訳産物に結合し得る低分子化合物、天然高分子から選択されるいずれかである前項2に記載の新規抗腫瘍剤。

4．ARHGAP 11A を阻害しうる物質が、当該ARHGAP 11A をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、オリゴヌクレオチドを構成

する塩基が１４塩基～２００塩基であり、当該塩基配列中に人工核酸を少なくとも１以上含むことを特徴とする前項３に記載の新規抗腫瘍剤。

５．アンチセンスオリゴヌクレオチドが、以下の１）～１３）のいずれかに示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである、前項４に記載の新規抗腫瘍剤：

１）ARHGAP-625-BNA-1 6 :5(L)T(L)5(L)aaatttgaa5(L)T(L)5(L)c (配列番号１０)；

２）ARHGAP-969-BNA-1 6 :T(L)5(L)5(L)gaaaaagcc5(L)T(L)T(L)c (配列番号１３)

３）ARHGAP-1 344-BNA-1 6 :T(L)5(L)T(L) tttcatgtc5(L)T(L)T(L)c (配列番号１６)；

４）ARHGAP-1447-BNA-1 6 :T(L)5(L)5(L)aggataaaaT(L)5(L)T(L)g (配列番号１７)；

５）ARHGAP-1 748-BNA-1 6 :5(L)T(L)T(L)gatggactt5(L)5(L)T(L) t (配列番号１９)

６）ARHGAP-1 931 -BNA-1 6 :T(L)T(L)T(L)gcctgcaatT(L)5(L)T(L) t (配列番号２１)；

７）ARHGAP-2032-BNA-1 6 :5(L)5(L)T(L)agattgaatT(L)T(L)5(L)a (配列番号２２)

８）ARHGAPv1 -3484-BNA-1 6 :T(L)T(L)5(L)gagggtaacT(L)5(L)5(L)a (配列番号３０)；

９）ARHGAPv2-221 5-BNA-1 6 :5(L)T(L)5(L) taacagtagT(L)A(L)T(L)g (配列番号３４)；

１０）ARHGAPv2-2285-BNA-1 6 :T(L)5(L)T(L)agaacagtaA(L)A(L)T(L) t (配列番号３５)；

１１）ARHGAPv2-2306-BNA-1 6 :T(L)T(L)5(L)aaacatgaa5(L)T(L)T(L) t (配列番号３６)；

１２）ARHGAPv2-2355-BNA-1 6 :T(L)5(L)5(L)caattgttgA(L)T(L)A(L)g (配列

番号３７）；

１３）ARHGAPv2-2404-BNA-1６:T(L)T(L)T(L) taacataagA(L)A(L)T(L)g （配列番号３８）。

[ここにおいて、N(l_)は人工核酸BNA、5(l_)はL-mC（メチル化人工核酸BNA)、T(l_)は人工核酸チミジン、A(l_)は人工核酸アデニンを表す。]

６．ARHGAP1 1Aを阻害しうる物質が、RNA干渉を誘導するオリゴヌクレオチドであって、以下の１４）又は１５）に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである、前項３に記載の新規抗腫瘍剤：

１４）ARHGAP1 1A #1 (TRCN0000047281）:CCGGCGGTATCAGTTCACATCGATACTCGAGTATCGATGTGAACTGATACCGTTTTTG（配列番号１）；

１５）ARHGAP1 1A #2 (TRCN0000047282) :CCGGCCTTCTATTACACCTCAAGAACTCGAGTTCTTGAGGTGTAATAGAAGGTTTTTG（配列番号２）。

７．抗腫瘍剤が、悪性腫瘍の転移阻害作用及び/又は浸潤阻害作用を有することを特徴とする、前項１～６のいずれか１項に記載の新規抗腫瘍剤。

８．細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質を選別することを特徴とする新規抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

９．細胞周期依存性のRhoGAPが、ARHGAP1 1Aである、前項８に記載のスクリーニング方法。

１０．少なくとも以下のＡ）～Ｄ）の工程を含むことを特徴とする前項９に記載のスクリーニング方法：

Ａ）候補物質をがん細胞株と共に培養し、該細胞におけるARHGAP1 1Aをコードする遺伝子の発現量を測定する工程；

Ｂ）対照の系で同手法により測定されたARHGAP1 1Aをコードする遺伝子の発現量を測定する工程；

Ｃ）前記Ａ）及びＢ）の工程により測定されたARHGAP1 1Aをコードする遺伝子の発現量と、比較する工程；

Ｄ）Ａ）の工程により測定された遺伝子の発現量が、Ｂ）の工程により測定された遺伝子の発現量に比べて低い場合の候補物質を選別する工程。

１１．生体検体中の細胞周期依存性のRhoGAPを定量することを特徴とする悪性腫瘍の検査方法。

１２．細胞周期依存性のRhoGAPが、ARHGAP11Aである、前項１１に記載の悪性腫瘍の検査方法。

１３．悪性腫瘍が、大腸がんやすい臓がん、前立腺がん細胞、乳がん、頭頸部がん、黒色腫（メラノーマ）、卵巣がん、肺がん、脳がん、膵臓がん、肝細胞がん、腎細胞がん、皮膚がんから選択される一種又は複数種である、前項１１又は１２に記載の悪性腫瘍の検査方法。

１４．悪性腫瘍の検査が、がんの進行度及び/又は予後を予測するための検査である、前項１１～１３のいずれか１項に記載の悪性腫瘍の検査方法。

１５．細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質からなる悪性腫瘍の転移阻害剤及び/又は浸潤阻害剤。

１６．細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質が、ARHGAP11Aを阻害しうる物質である、前項１５に記載の悪性腫瘍の転移阻害剤及び/又は浸潤阻害剤。

１７．ARHGAP11Aを阻害しうる物質が、ARHGAP11Aをコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド又はRNA干渉を誘導するオリゴヌクレオチドであり、或いはARHGAP11Aをコードする遺伝子の転写産物若しくは翻訳産物に結合し得る低分子化合物、天然高分子から選択されるいずれかである前項１６に記載の悪性腫瘍の転移阻害剤及び/又は浸潤阻害剤。

１８．ARHGAP11Aを阻害しうる物質が、当該ARHGAP11Aをコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、オリゴヌクレオチドを構成する塩基が１４塩基～２００塩基であり、当該塩基配列中に人工核酸を少なくとも１以上含むことを特徴とする前項１７に記載の悪性腫瘍の転移阻害剤及び/又は浸潤阻害剤。

１９．アンチセンスオリゴヌクレオチドが、以下の１）～１３）のいずれかに示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである、前項１８に記載の悪性腫瘍の転移阻害剤及び/又は浸潤阻害剤：

１） ARHGAP-625-BNA-1 6 : 5(L)T(L)5(L)aaatttgaa5(L)T(L)5(L)c （配列番号１０）；

２） ARHGAP-969-BNA-1 6 : T(L)5(L)5(L)gaaaaagcc5(L)T(L)T(L)c （配列番号１３）

３） ARHGAP-1 344-BNA-1 6 : T(L)5(L)T(L) tttcatgtc5(L)T(L)T(L)c （配列番号１６）；

４） ARHGAP-1447-BNA-1 6 : T(L)5(L)5(L)aggataaaaT(L)5(L)T(L)g （配列番号１７）；

５） ARHGAP-1 748-BNA-1 6 : 5(L)T(L)T(L)gatggactt5(L)5(L)T(L) t （配列番号１９）

６） ARHGAP-1 931 -BNA-1 6 : T(L)T(L)T(L)gcctgcaatT(L)5(L)T(L) t （配列番号２１）；

７） ARHGAP-2032-BNA-1 6 : 5(L)5(L)T(L)agattgaatT(L)T(L)5(L)a （配列番号２２）

８） ARHGAPv1 -3484-BNA-1 6 : T(L)T(L)5(L)gagggtaacT(L)5(L)5(L)a （配列番号３０）；

９） ARHGAPv2-221 5-BNA-1 6 : 5(L)T(L)5(L) taacagtagT(L)A(L)T(L)g （配列番号３４）；

１０） ARHGAPv2-2285-BNA-1 6 : T(L)5(L)T(L)agaacagtaA(L)A(L)T(L) t （配列番号３５）；

１１） ARHGAPv2-2306-BNA-1 6 : T(L)T(L)5(L)aaacatgaa5(L)T(L)T(L) t （配列番号３６）；

１２） ARHGAPv2-2355-BNA-1 6 : T(L)5(L)5(L)caattgttgA(L)T(L)A(L)g （配列番号３７）；

１３） ARHGAPv2-2404-BNA-1 6 : T(L)T(L)T(L) taacataagA(L)A(L)T(L)g （配列番号３８）。

[ここにおいて、N(l_) は人工核酸BNA、5(l_) はL-mC（メチル化人工核酸BNA）、T(l_) は人工核酸チミジン、A(l_) は人工核酸アデニンを表す。]

２０．ARHGAP1 1Aを阻害しうる物質が、RNA干渉を誘導するオリゴヌクレオチドであって、以下の１４）又は１５）に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである、前項１７に記載の悪性腫瘍の転移阻害剤及び/又は浸潤阻害剤：

１４）ARHGAP1 1A #1 (TRCN0000047281）:CCGGCGGTATCAGTTCACATCGATACTCGAGTATCGATGTGAACTGATACCGTTTTTG（配列番号１）；

１５）ARHGAP1 1A #2 (TRCN0000047282) :CCGGCCTTCTATTACACCTCAAGAACTCGAGTTCTTGAGGTGTAATAGAAGGTTTTTG（配列番号２）。

２１．前項1～7のいずれかに記載の新規抗腫瘍剤を用いる悪性腫瘍の治療及び/又は予防方法。

発明の効果

[001 1] 本発明の細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質を有効成分として含有する新規抗腫瘍剤により、ARHGAP1 1Aを発現しうるがん、例えば大腸がん、すい臓がん、前立腺がん細胞、乳がん、頭頸部がん、黒色腫(メラノーマ）、卵巣がん、肺がん、脳がん、滕臓がん、肝細胞がん、腎細胞がん、皮膚がん等に由来するがん細胞等について、がん細胞の浸潤及び/又は転移が抑制される。従来、がん細胞の浸潤及び/又は転移を抑制しうる抗腫瘍剤で有効な薬剤はほとんど存在しなかった。がんの悪性化に影響を及ぼす、がん細胞の浸潤及び/又は転移を抑制しうる薬剤の提供により、効果的ながん治療ができる。

さらに、生体検体中のARHGAP1 1Aの発現を例えばmRNAにより検査した結果、がんの進行度(病期ステージ分類）や、無再発生存期間との関係で有意な違いが認められた。このことから、生体検体中の細胞周期依存性のRhoGAPを定量することで、悪性腫瘍を検査することができる。

図面の簡単な説明

[001 2] [図1]がん組織における転移/浸潤がん細胞の組織免疫による組織を示す写真図である。(参考例１)

[図2]ヒト大腸がん細胞に細胞周期をリアルタイムで可視化するFucc iを遺伝

子導入し、蛍光顕微鏡とFACSで確認した写真図である。（参考例2）

[図3]N0D/SCID マウスに移植したヒト大腸がん細胞について、細胞の細胞周期によって細胞の移動速度が違うことを確認した写真図である。S/G2/M期の細胞のほうが、G1期の細胞に比べて、細胞の可動性が大きい。（参考例2）

[図4]S/G2/M 期の細胞（mAG）とG1期の細胞（mK02）について、mRNAレベル及びタンパク質でのARHGAP11Aの発現を確認した写真図である。（参考例2）

[図5]細胞周期依存性転写因子の存在とARHGAP11Aの発現との関係を示す図である。（参考例3）

[図6]各種細胞におけるARHGAP11Aの発現を確認した図である。（参考例4）

[図7]ARHGAP11AをshRNAで阻害したヒト大腸がん細胞の変異株について、細胞増殖度及び可動性を確認した図である。（実施例1）

[図8]免疫不全マウス（N0D/SCID）に野生株のヒト大腸がん細胞を移植したのちに、ARHGA11Aに対するshRNAを局所投与したときの腫瘍の大きさを確認した結果を示す図である。（実施例2）

[図9]大腸がんのステージと、mRNAレベルでのARHGAP11Aの発現を確認した図である。（実施例3）

[図10]大腸がん摘出手術を施行した患者について、ARHGAP11Aの発現が平均より低い患者群（n=38）と高い患者群（n=26）での、無再発生存期間を確認した結果を示す図である。（実施例4）

[図11]人工核酸を含む35種類のアンチセンスオリゴヌクレオチド（アンチセンスBNA）による、HCT116（ヒト大腸がん細胞株）でのARHGAP11A発現抑制効果を確認した結果を示す図である。（実施例5）

[図12]人工核酸を含む5種類のアンチセンスオリゴヌクレオチド（アンチセンスBNA）による、各種がん細胞でのARHGAP11A発現抑制効果を、ウェスタンプロッティングにより確認した結果を示す写真図である。（実施例6）

[図13]（A）アンチセンスBNA（#1748）を導入したHCT116における、ARHGAP11Aの発現抑制効果を確認した写真図である。（B）また、HCT116へのアンチセンスBNA（#1748）の取り込みをFITC（fluorescein isothiocyanate）標識

アンチセンスBNA (#1 748) を用いて確認した写真図である。 (実施例7)
[図14] 免疫不全マウス (N0D/SCID) について、FITC標識アンチセンスBNA (#1 748) 投与によるin vivoでの抗腫瘍効果を示す図である。 (実施例8)
[図15] 免疫不全マウス (N0D/SCID) について、FITC標識アンチセンスBNA (#1 748) 投与後14日目での各臓器へのFITC標識の取り込みを確認した結果を示す写真図である。 (実施例8)
[図16] アンチセンスBNA (#1 748) の腫瘍転移抑制効果を確認するための、各薬剤の投与スケジュールを示す図である。 (実施例9)
[図17] ヒト線維肉腫細胞を静脈注射したヌードマウスについて、アンチセンスBNA (#1 748) を投与したときの肺転移腫瘍の大きさをイメージングにて確認した結果を示す写真図である。 (実施例9)
[図18] ヒト線維肉腫細胞を静脈注射したヌードマウスについて、アンチセンスBNA (#1 748) を投与したときの肺重量及び体重を測定した結果を示す図である。 (実施例9)

発明を実施するための形態

[001 3] 本発明は、細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質を有効成分として含有する新規抗腫瘍剤に関する。本発明において、細胞周期依存性のRhoGAPとしては、ARHGAP1 1A (Rho GTPase act i vat i ng prote i n 11A) が挙げられる。

[0014] 後述の実施例、実験例で具体的な事件結果を詳述するが、本欄では本発明をなすに至った経緯を、簡単に説明する。本発明者らは、独自に確立したがん組織の生体イメージング実験系を用いて、がん細胞が正常組織に浸潤していく様子をリアルタイムで解析し、S/G2/M 期の細胞ではG1期の細胞に比べて可動性が高いことを見いだした。がん細胞のうち、S/G2/M とG1の細胞を分取してマイクロアレイ解析を行うことにより、細胞周期に依存する遺伝子を抽出し、その中で可動性に関連するARHGAP1 1AがS/G2/M 期の細胞に高発現していることを初めて見出した。shRNA (低分子ヘアピンRNA) を用いてARHGAP1 1Aを阻害したがん細胞は、野生株のがん細胞よりも可動性が低く、腫瘍の進展速度が低下していることが確認された。さらに、免疫不全マウス (N0D/SCID)

に野生株のがん細胞を移植したのちに、ARHGA1 1Aに対するsiRNA (低分子干渉RNA) をin vivoで局所投与すると、腫瘍の拡大を有意に抑制することができた。

[0015] がん細胞が、培養器内で増殖する際には空間的制限がないが、生体内で増殖するためには、細胞分裂と同時に周囲の正常組織に浸潤していくことが必要である。本発明者らは、大腸がん細胞の細胞周期を可視化する蛍光タンパク質を取り込ませ、多光子励起顕微鏡を用いて生体内イメージングを行った。その結果、がん細胞の浸潤・遊走能が、細胞周期に依存するS/G2/M 期で細胞可動性が亢進することを初めて見出した (図２、３)。G1期とS/G2/M 期の細胞で発現する分子をマイクロアレイ法で解析した結果、細胞可動性を低下させるRhoGTP 分解活性タンパク質 (RhoGAP) の一種である「ARHGAP 11A」がS/G2/M 期の細胞でG1期の細胞に比べ10培以上高発現していることを確認した。

[0016] 本発明においてARHGAP 11Aとは、代表的なものとして、GenBank Accession No. NM_014783. 3 (バリアント1) 又はGenBank Accession No. NM_199357. 1 (バリアント2) で特定される塩基配列からなるmRNAより合成されるヒト由来タンパク質が挙げられる。また、ARHGAP 11Aを別の視点から定義すると、GenBank Accession No. NM_014783. 3又はNMJ 99357. 1で特定される塩基配列から翻訳されるアミノ酸配列、又は前記アミノ酸配列において、一つ以上のアミノ酸の欠失、付加、置換又は挿入を有し、かつ、細胞周期依存性のRhoGTP 分解活性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質が含まれる。さらに、ヒト以外の哺乳動物由来のARHGAP 11Aも本発明のARHGAP 11Aに含めることができる。

[0017] 本発明においてARHGAP 11A遺伝子とは、GenBank Accession No. NM—014783. 3又はNMJ 99357. 1で特定される塩基配列からなるmRNAをコードするDNAの他、これら配列と類似の配列を保持するDNAも含めることができる。ここで 類似の配列」とは、GenBank Accession No. NM—014783. 3又はNMJ 99357. 1で特定される塩基配列から一つ以上のヌクレオチドの欠失、付加、置換又は挿入を有し、細胞周期依存性のRhoGAP 活性を有するタンパク質を合成しうる塩基配

列からなるDNAとすることができる。さらに、上記で特定される塩基配列からなるDNA、若しくは当該特定される塩基配列から一つ以上のヌクレオチドの欠失、付加、置換又は挿入を有し、細胞周期依存性のRhoGAP活性を有するタンパク質を合成しうる塩基配列からなるDNA、又はその一部配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る配列を有するDNAも、本発明のARHGAP1 1A遺伝子に包含される。ストリンジェントな条件とは、一般に、ハイブリダイズの際又は洗浄の際に使用される緩衝液の塩濃度や温度により規定される。塩濃度としては、通常は「1X SSC、0.1% SDS」、より厳しい条件としては「0.5X SSC, 0.1% SDS」、さらに厳しい条件として「0.1X SSC、0.1% SDS」とすることができる。温度としては通常37℃、厳しい条件としては42℃、より厳しい条件として55℃、さらに厳しい条件としては65℃とすることができる。

[001 8] 本明細書において、細胞周期依存性のRhoGTP分解活性タンパク質(Rho GTPase activating protein)、即ち細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質とは、当該RhoGAPの機能を阻害及び/又は発現を阻害する物質をいう。RhoGAPの機能を阻害するとは、RhoGAPのタンパク質としての機能を阻害することをいい、RhoGAPの発現を阻害するとは、RhoGAPの生合成を阻害することと同義である。RhoGAPの生合成を阻害しうる物質としては、RhoGAP遺伝子、又は転写産物若しくは翻訳産物に結合し得る物質が挙げられる。RhoGAP遺伝子の転写産物とは、具体的にはRhoGAP mRNA及び前駆RNAなどが挙げられる。RhoGAPの生合成を阻害しうる物質であれば抗腫瘍効果が期待できる。より具体的には、当該RhoGAPをコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやRNAi (RNA interference, RNA干渉)を誘導するオリゴヌクレオチド(shRNA、siRNA、microRNA)、転写産物若しくは翻訳産物に結合し得る低分子化合物、天然高分子から選択されるいずれかが挙げられる。

[001 9] RhoGAPがARHGAP1 1Aの場合には、ARHGAP1 1Aを阻害しうる物質とは、当該ARHGAP1 1Aの機能を阻害及び/又は発現を阻害する物質をいう。ARHGAP1 1Aの機能を阻害するとは、ARHGAP1 1Aのタンパク質としての機能を阻害することをいい、ARHGAP1 1Aの発現を阻害するとは、ARHGAP1 1Aの生合成を阻害することと同

義である。ARHGAP 11Aの生合成を阻害しうる物質としては、ARHGAP 11A遺伝子、又は転写産物若しくは翻訳産物に結合し得る物質が挙げられる。より具体的には、当該RhoGAP をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドやRNAi (RNA interference, RNA干渉）を誘導するオリゴヌクレオチド (shRNA 、siRNA、microRNA) 、転写産物若しくは翻訳産物に結合し得る低分子化合物、天然高分子から選択されるいずれかが挙げられる。尚、本明細書における 核酸」、 「ヌクレオチド」、 「ヌクレオシド」は、デオキシリボ核酸 (DNA) 、リボ核酸 (瞧) の他に、PNA (Peptide Nucleic Acid)やBNA (Bridged Nucleic Acid) 、及びこれらの類縁体などの人工的に合成された核酸 (以下、 「人工核酸」という）も含まれる。BNAは、例えば株式会社ジーンデザインが作製する核酸 (Bridged Nucleic Acid :架橋化核酸）を使用することができる。

[0020] アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば上記ARHGAP 11A遺伝子転写産物の配列に基づき、該転写産物と対合し得るように配列をデザインすることができる。アンチセンスヌクレオチドはDNA又はRNAのいずれから構成されてもよく、天然には存在しない人工核酸を含むオリゴヌクレオチドであるのが好適である。人工核酸を含むことで、より安定性の高いオリゴヌクレオチドを得ることができる。また、オリゴヌクレオチドの塩基配列の長さは、特に制限されないが、少なくとも対象とする遺伝子の特異性を保持し得る長さを有していればよく、長さの上限はmRNAと同等の長さとしてもよい。一般には、14塩基～200 塩基、好ましくは15塩基から50塩基とすることができる。

[0021] RNAi (RNA interference, RNA干渉) を誘導するdsRNA (二重鎖RNA) にはsiRNA、shRNA 、microRNAなどの形態が知られており、本発明はこれら全てを包含し得る。dsRNA は、上記ARHGAP 11A遺伝子の転写産物の一部領域と相補し得るアンチセンス鎖と、このアンチセンス鎖と対合し得る配列からなるセンス鎖とから構成される。すなわち、dsRNA の二重鎖領域は、ARHGAP 11A遺伝子上の標的とする領域のDNA配列をリボ核酸に変更した配列に相当する。なお、ARHGAP 11Aの発現を阻害し得る限り、アンチセンス鎖の配列中に標的とするARHG

AP11A遺伝子と相補しない配列を有していてもよく、また、センス鎖配列中にアンチセンス鎖と対合しない配列を有していてもよい。上記dsRNA の二重鎖領域の長さは、一例を示せば、16~49 塩基対、好適には16~30 塩基対、さらに好適には19~21塩基対とすることができる。長いdsRNA は、細胞毒性を有することから、この毒性を与えない範囲で、長さの上限を決定することができる。また、dsRNA の長さの下限は、特異性を保持し得る範囲で調整することができる。

[0022] 細胞周期依存性のRhoGAP、例えばARHGAP11Aの発現を効果的に阻害し得るARHGAP11A遺伝子上の標的領域又は具体的なshRNA、siRNAやmicroRNAなどの配列は、例えば、DHARMACON社（http://design.dharmacon.com)、Ambion社（http://www.ambion.com/techLib/misc/siRNA_finder.html)、タカラバイオ株式会社（http://www.takara-bio.co.jp/rnai/intro.htm) など、自体公知のデザインツールを利用してデザインすることもできる。また、合成器などにより人工的に合成した合成オリゴdsRNA として調製してもよい。又は、dsRNA をコードしたDNAを担持した発現ベクターから細胞内でsiRNAを発現させる構成としてもよい。細胞内でdsRNA を発現させる際のベクターは、導入したい細胞などにより任意に選択することができる。例えば、哺乳動物細胞では、レトロウィルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウィルスベクター、ワクシニアウィルスベクター、レンチウィルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウィルスベクター、EBウィルスベクター、パピローマウィルスベクター、フォーミーウィルスベクターなどのウィルスベクターなどが挙げられる。これら発現ベクターにはdsRNA を転写させるためのプロモータを備え、その下流にdsRNA をコードしたDNAを連結するすることができる。また、プロモータやdsRNA の構築方法などは、自体公知の方法を適用することができる。

[0023] 本発明の新規抗腫瘍剤に有効成分として含有される"細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質"が、当該細胞周期依存性のRhoGAP、例えばARHGAP11Aをコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、shRNA、siRN

A、microRNAなどの核酸物質の場合は、当該核酸物質を作用させたい細胞内に導入することが好ましい。核酸物質の導入手法としては、リポフエクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポーレシヨン、ジーンガンなど、自体公知の方法、或いは開発されている遺伝子導入技術を適用することができ、市販の遺伝子導入試薬又はキットを利用することができる。また、感染力を保持したウィルスベクターを用いたdsRNA発現ベクターなどの場合には、ウイルスの感染力により細胞にベクターを取込ませることができる。

[0024] 本発明の新規抗腫瘍剤に有効成分として含有される"細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質"のうち、天然高分子の例として抗体が挙げられる。抗体は、ポリクローナル抗体であっても良いし、モノクローナル抗体であってもよい。抗体は、自体公知の方法により作製し、得ることができる。

[0025] 上述した本発明の新規抗腫瘍剤により、がん細胞の可動性・浸潤能が著しく低下し、浸潤及び/又は転移を抑制することができる。従って本発明は、"細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質"からなる悪性腫瘍の転移阻害剤及び/又は浸潤阻害剤にも及ぶ。

[0026] 本発明の"細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質"を有効成分とする新規抗腫瘍剤が標的とするがん細胞は、特に限定されないが、当該細胞周期依存性のRhoGAP、例えばARHGAP11Aの発現により、がん細胞の転移や浸潤が誘導される可能性のあるがん細胞を挙げることができる。具体的には、大腸がんやすい臓がんの他、前立腺がん細胞、乳がん、頭頸部がん、黒色腫(メラノーマ)、卵巣がん、肺がん、脳がん、滕臓がん、肝細胞がん、腎細胞がん、皮膚がん等に由来するがん細胞を挙げることができ、特に好適には大腸がんやすい臓がんが挙げられる。

[0027] さらに、本発明の"細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質"を有効成分とする新規抗腫瘍剤は、がんが組織に浸潤し固有筋層、漿膜、漿膜外に達するT2、3、4ステージ(UICCのTNM分類による)のがんに対してより有効に作用しうることが考えられる。本発明において治療標的であるARHGAP11AなどのRhoGAPが、T2、3、4ステージのがんにおいて上昇することが明らか

となったからである。

[0028] 本発明の"細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質"を有効成分とする新規抗腫瘍剤には、本成分に必要に応じて、他の成分を混合処方してもよい。また、本新規抗腫瘍剤も公知の製剤学的製造法を利用して製剤化することができる。有効成分に応じて核酸製剤として、また低分子化合物製剤として製剤化することができる。製剤化する場合は、例えば、薬剤として一般的に用いられる媒体又は担体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせて製剤化することができる。従って本発明は、本発明の"細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質"を有効成分とする新規抗腫瘍剤を用いる悪性腫瘍の治療及び/又は予防方法にも及ぶ。

[0029] 本発明は、"細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質"を選別することを特徴とする新規抗腫瘍剤のスクリーニング方法にも及ぶ。本明細書における細胞周期依存性のRhoGAPの代表例としては、上述したごとくARHGAP1 1Aが挙げられる。具体的には少なくとも以下のA)~D)の工程を含むことを特徴とするスクリーニング方法に及ぶ。A)の工程及びB)の工程は、いずれの工程を先に行ってもよいし、同時に行ってもよい。ここで、スクリーニングによって選別される候補物質としては、核酸物質、低分子化合物又は天然高分子を上げることができる。具体的には、当該ARHGAP1 1Aをコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、shRNA、siRNA、microRNA, 転写産物若しくは翻訳産物に結合し得る低分子化合物、天然高分子等が挙げられる。天然高分子の例として、抗体が挙げられる。抗体は、ポリクローナル抗体であっても良いし、モノクローナル抗体であってもよい。抗体は、自体公知の方法により作製し、得ることができる。

[0030] A)候補物質をがん細胞株と共に培養し、該細胞における細胞周期依存性の特定のRhoGAP (例えば、ARHGAP1 1A) をコードする遺伝子の発現量を測定する工程;

B)対照の系で同手法により測定された特定のRhoGAPをコードする遺伝子の

発現量を測定する工程 ;

C) 前記A) 及びB) の工程により測定された特定のRhoGAPをコードする遺伝子の発現量と、比較する工程 ;

D) A) の工程により測定された遺伝子の発現量が、B) の工程により測定された遺伝子の発現量に比べて低い場合の候補物質を選別する工程。

[0031] 上記スクリーニング方法の工程B) では、候補物質を含まない系でがん細胞を培養し、工程A) と同手法により測定された特定のRhoGAPをコードする遺伝子の発現量を測定する工程をいう。上記工程A) 及び工程B) で使用しうるがん細胞は、特定のRhoGAP (例えば、ARHGAP1 1A) を発現しうる細胞であればよく、特に限定されないが、例えば大腸がんやすい臓がん、前立腺がん細胞、乳がん、頭頸部がん、黒色腫 (メラノーマ)、卵巣がん、肺がん、脳がん、滕臓がん、肝細胞がん、腎細胞がん、皮膚がん等に由来する細胞株が挙げられ、好ましくは大腸がん又はすい臓がんが挙げられる。特に具体的には、大腸がん細胞株であるHCT1 16を用いるのが最も好適である。

[0032] 細胞周期依存性のRhoGAP、例えばARHGAP1 1Aをコードする遺伝子の発現量の確認は、リアルタイムRT-PCR法、ノーザンプロッティング、ウェスタンプロッティング、免疫染色等の自体公知の手法や今後開発される新たな手法によることができる。

[0033] 本発明は、生体検体中の細胞周期依存性のRhoGAP、例えばARHGAP1 1Aをコードする遺伝子の発現量を定量することを特徴とする悪性腫瘍の検査方法にも及ぶ。細胞周期依存性のRhoGAPとしては、ARHGAP1 1Aが挙げられる。遺伝子の発現量は、マイクロアレイ法、リアルタイム叮-PCR法、ノーザンプロッティング、ウェスタンプロッティング、免疫染色等の自体公知の手法や今後開発される新たな手法によることができる。

[0034] 本発明において生体検体とは、上記タンパク質を検出可能性な生体検体であればよく、特に制限されない。例えば組織、血漿、血清等の血液、脊髄液、リンパ液、尿、涙、乳等が広く例示され、好適な生体検体としては、組織が挙げられる。組織は、例えば摘出病変組織、バイオプシー、またはCTC (Ci

rcuLating tumor ceLL) 等により取得することができる。後述の実施例でも示すように、例えば大腸がん摘出手術を施行した患者について、ARHGAP11Aの発現が平均より低い患者群と高い患者群での、無再発生存期間を確認したところ、ARHGAP11Aの発現が低い患者群のほうが、有意に無再発生存率が低いことが確認された (図10)。このように、ARHGAP11Aが発現すると考えられる悪性腫瘍、例えば大腸がんやすい臓がん、前立腺がん細胞、乳がん、頭頸部がん、黒色腫 (メラノーマ)、卵巣がん、肺がん、脳がん、膵臓がん、肝細胞がん、腎細胞がん、皮膚がんから選択される一種又は複数種について、本発明の検査方法により、がんの進行度予測や予後予測を行うことができる。

実施例

[0035] 以下に、本発明を完成させるために行なった実験結果を参考例として示し、実施例において本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内で種々の応用が可能である。

[0036] (参考例1) 細胞周期の確認

まずはじめに、外科的に切除された大腸がん組織Geminin (細胞周期 :S/G2/Mステージ) に分類される細胞を抗Geminin (S/G2/M) ポリクローナル抗体を用いて組織免疫染色法により染色したところ、非がん部位 (A)、がん細胞浸潤先端部位 (B) 及びがん中心部位 (C) について確認した。その結果、(B) の部位でGemininが最も強く染色され、S/G2/M 期の細胞がん細胞浸潤先端部位に多く存在することが確認された (図1)。

[0037] (参考例2) 運動型細胞の解析

がん組織の生体イメージング実験系を用いて、HCT116 (ヒト大腸がん細胞株) が正常組織に浸潤していく様子をリアルタイムで解析した。S/G2/M とG1の細胞を分取してマイクロアレイ解析を行うことにより、細胞周期に依存する遺伝子を抽出し、その中で可動性に関連するARHGAP11AがS/G2/M 期の細胞に高発現していることを初めて見出した。

[0038] N0D/SCIDマウスの盲腸又は皮下に、蛍光プローブ (Fucci :Fluorescent Ub

iquitination-based CeLL CycLe Indicator) で表現されたHCT116を移植し、HCT116の細胞周期進行を可視化した。Fucciは G1期の核を赤色 (mK02) に、S/G2/M 期の核を緑色 (mAG) に光らせた。G1期の可視化には、Cdt1タンパク質の一部を、S/G2/M 期の可視化には、Gemininタンパク質の一部を用いた。Fucciを表現する細胞は、FACSAria II (BD バイオサイエンス社)により、S/G2/M 期の細胞を表現するmAGとG1期の細胞を表現するmK02 に分離された。Fucciを恒常的に発現させることで安定に細胞周期を可視化することができる。その結果、HCT116ではS/G2/M 期の細胞が多く移動することが確認された (図2)。細胞トラッキング速度を確認した結果、S/G2/M 期の細胞のほうがG1期の細胞に比べて平均移動距離が大きく、可動性のある細胞であることが確認された (図3)。

[0039] 次に、cDNA によるマイクロアレイを用いて、S/G2/M 期の細胞及びG1期の細胞に発現しているmRNA を解析した。マイクロアレイ分析では、2倍以上上昇し統計学的に有意な1656 遺伝子が抽出された (表1)。その結果、特にRhoGAP であるARHGAP11A がS/G2/M 期の細胞に強く発現していることが、遺伝子レベル及びタンパク質レベルで確認された (表1、図4)。

[0040] (参考例3) 細胞周期依存性転写因子E2F によるARHGAP11Aの発現制御について

E2F ファミリーは、細胞周期依存性の転写調節因子であることが知られている。ARHGAP11A (chr15: 32907691) の転写開始部位から-20-28b (chr15: 32907663-32907671) の部位にE2Fs が結合する配列があることに気づき、ARHGAP11Aの発現は、細胞周期依存性の転写因子であるE2F によって制御されていることを、ルシフェラーゼレポーターアツセイ (図5A) 及びクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により確認した。ARHGAP11Aの発現を阻害すると、がん細胞の遊走-浸潤能が低下することが確認され、治療標的として有望であることが示された (図5B)。

[0041]

[表1]

Rho GAPs

Rank	Gene	FC
5	ARHGAP11A	18.85
12	ARHGAP11A	14.90
41	ARHGAP11A	11.03
57	DEPDCID	9.84
106	IQGAP3	7.47

[0042] (参考例4) 対象となる疾患について

本参考例では、本発明の新規抗腫瘍剤が標的とするがん細胞を確認した。即ちARHGAP 11Aが発現することで、転移や浸潤が誘導される可能性のあるがん細胞が、本発明のARHGAP 11Aを阻害しうる物質を有効成分とする新規抗腫瘍剤が標的とするがん細胞であると考えられた。ヒト大腸がん細胞(HCT116)、ヒト肝臓がん細胞(HepG2)、リンパ管線維芽細胞(Human Lymphatic Fibroblasts:HLF)、ヒト膵臓腺がん細胞(PSN1、MiaPaca2、Panel)について、ARHGAP 11Aの発現を定量的リアルタイムPCRの方法で確認した。βアクチンを内部コントロールとし、βアクチンの発現量を1としたときの相対値を示した。その結果、ARHGAP 11Aの発現を認めたヒト大腸がん細胞やヒト膵臓腺がん細胞に由来するがん細胞(HCT116、PSN1)においてARHGAP 11Aの発現が認められた(図6)。よって、これらのがん細胞に対して、本発明の新規抗腫瘍剤が有効に作用しうると考えられる。

また、GeneNoteのGeneCards ID:GC15P032907を参照したところ、マイクロアレイによるARHGAP 11A発現が、大腸がん、すい臓がん、前立腺がん、乳がん、頭頸部がん、黒色腫(メラノーマ)、卵巣がん、肺がん、脳がん、膵臓がん、肝細胞がん、腎細胞がん、皮膚がん等に由来する各がん細胞において認められており、これらのがん細胞に対して、本発明の新規抗腫瘍剤が有効に作用しうると考えられる。なお、GeneNoteのGeneCards ID:GC15P032907では、各がん細胞において発現が認められたことが掲載されているのみであり、ARHGA

P11Aの発現によるがん細胞に及ぼす影響や、ARHGAP11Aを阻害する場合の効果については一切言及されていない。

[0043] （実施例1）ARHGAP11A阻害作用による抗腫瘍効果の確認

本実施例では、細胞周期依存性RhoGAPのうちARHGAP11Aの機能を確認し、本発明の新規抗腫瘍剤の効果を確認した。以下の配列番号1又は2に示す塩基配列からなる2種類のshRNA(SH)を含むレンチウィルスベクターを作製し、HCT116（ヒト大腸がん細胞株）に各々を導入し、ARHGAP11A発現阻害株（SH#1、SH#2）を構築した。コントロールとして、以下の配列番号3に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含むレンチウィルスベクターを作製し、同手法によりHCT116に導入した。それぞれのARHGAP11A発現阻害株（SH#1、SH#2）について、細胞増殖能及び細胞浸潤を確認した。

[0044] 細胞増殖については、標識DNAの前駆物質（5-ブロモ-2'-デオキシウリジン BrdU）を細胞に添加し、細胞周期（複製）のS期における、ゲノムDNAへのそれらの取込みを、定量化したものについて分析を行うBrdU増殖分析法により分析した。がん細胞浸潤アッセイは、BD BioCoat™ マトリゲルインベージョンチャンバーを用い、取扱説明書の方法に従い行った。その結果、細胞増殖能についてはコントロールとの違いは認められなかった（図7A）。細胞浸潤能は、コントロールに比べてARHGAP11A発現阻害株（SH#1、SH#2）のほうに低い値が認められた（図7B）。よって、ARHGAP11A発現阻害株で浸潤が抑制されることが観察された（図7A，B）。以上のことから、ARHGAP11Aを阻害する杭がん治療は、ヒトの大腸がんの浸潤を抑制する画期的な治療法であと考えられ、今後の創薬開発が強く期待される。

[0045] ARHGAP11Aに対するshRNA及びコントロールのDNA配列は以下のとおりである。

shRNA target :Sequence Strand (5’-3’)

1）ARHGAP11A #1 (TRCN0000047281) :CCGGCGGTATCAGTTCACATCGATACTCGAGTATCGATGTGAACTGATACCGTTTTTG（配列番号1）

2）ARHGAP11A #2 (TRCN0000047282) :CCGGCCTTCTATTACACCTCAAGAACTCGAGTT

CTTGAGGTGTAATAGAAGGTTTTTG (配列番号２)

３）コントロール (SHC002) : CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCT TCATCTTGTTGTTTTT (配列番号３)

[0046] (実施例２) ARHGAP 11A阻害作用による抗腫瘍効果の確認

本実施例では、ｉｎ ｖｉｖｏでのARHGAP 11A阻害作用による抗腫瘍効果を確認した。

免疫不全マウス (N0D/SCID) に、レンチウィルスベクターを導入していない野生株のHCT 116を１Ｘ１$0^6$ceLL局注し、移植した。

その後、実施例１で作製した配列番号１又は２に示す塩基配列からなるshRNA (SH) を含むレンチウィルスベクター (SH#1、又はSH#2) をｉｎ ＶｉＶｏ ｓｉRNA導入キットであるAteLoGene (R) (Koken) を用いて局注した (ｓｉRNA投与群)。対照群として、(a) 実施例１で作製した配列番号３からなる塩基配列からなるｓｈRNAを含むレンチウイスルベクター (コントロールshRNA 群) 又は (b) 遺伝子組換えしていないレンチウィルスベクター１をAteLoGene (R) (Koken) を用いて上記の如く導入した (遺伝子導入試薬コントロール群) さらに、(c) レンチウィルスを局注していない系 (コントロール群) についても対照とした。移植４週間経過後の腫瘍細胞の拡大を、腫瘍サイズの大きさで確認した。ARHGAP11Aに対するshRNA を腫瘍に投与すると、腫瘍の拡大を有意に抑制することができた (図８)。

[0047] (実施例３) ARHGAP 11Aの発現と大腸がん患病期分類との関係

大腸がん摘出手術を施行した患者について、手術標本よりがん組織部位をレーザーマイクロダイセクション法 (Laser microdissection) にて分取し、これよりmRNA を分離してARHGAP 11Aの発現をマイクロアレイ法にて確認した。大腸がん及び正常大腸粘膜の手術切除標本について比較すると、がん部位でARHGAP 11Aの発現が上昇しており、さらに大腸がんの病期分類によりステージが進行するにつれて、ARHGAP 11Aの発現が上昇していることが確認された。例えば、がんが組織に浸潤し固有筋層に達するＴ１ (UICC のTNM分類による) と比較してＴ２，Ｔ３，Ｔ４期で発現が上昇することが明らかとなった (図９

）。

[0048] （実施例４）がん摘出手術予後予測検査

大腸がん摘出手術を施行した患者について、がん摘出手術（根治的手術）が可能であった症例に対して、高発現群と低発現群に分類し、無再発生存期間を解析した。手術標本よりがん組織部位をレーザーマイクロダイセクション法（Laser microdissection）にて分取し、これよりmRNAを分離してARHGAP11Aの発現をマイクロアレイ法にて確認した。その結果、ARHGAP11Aの発現が平均より低い患者群（n=38）と高い患者群（n=26）での、無再発生存期間を確認したところ、ARHGAP11Aが低い患者群のほうが有意に生存率が高く、高発現群で予後が悪い事が確認された（図１０）。これにより、ARHGAP11Aの発現量を確認することで、がんの予後予測が可能と考えられる。なお実施例３及び４の内容は、国立大学法人九州大学の倫理委員会の了承を得、同大学の生体防御研究所でなされた試験結果に基づくものである。

[0049] （実施例５）ARHGAP11Aに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド（BNA）

本実施例では、人工核酸であるBNAを含む３５種類のアンチセンスオリゴヌクレオチド（以下、「アンチセンスBNA」という。）について、HCT116（ヒト大腸がん細胞株）でのARHGAP11Aに対する発現抑制効果を確認した。

[0050] まずはじめに、以下配列番号４～３８に示す塩基配列からなる３５種類のアンチセンスBNA及び配列番号３９～４１に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを作製した。ARHGAP11Aには、GenBank Accession No. NM_014783.3（バリアント１）又はGenBank Accession No. NM_199357.1（バリアント２）で特定される塩基配列からなるmRNAより合成されるヒト由来タンパク質が挙げられる。配列番号４～２３で特定される各アンチセンスBNAは、バリアント１及びバリアント２の共通配列部分に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖であり、配列番号２４～３３で特定される各アンチセンスBNAは、バリアント１に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖であり、配列番号３４～３８で特定される各アンチセンスBNAは、バリアント２に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖である。

以下に示す各配列において、N(l_) は人工核酸BNA、5は5-mC (メチルシトシン)、5(1_) はL-mC (メチル化人工核酸BNA) 、T(l_) は人工核酸チミジン、T(A) は人工核酸アデニンを示す。ここで使用するBNAは、株式会社ジーンデザインにより作製されたものである。

ARHGAP--47- BNA- 116 :T(L)5(L)5(L)gcccccagcT(L)5(L)5(L) t (配列番号4)

ARHGAP--126--BNA~16 :5(L)T(L)5(L)ccccatcag5(L)5(L)T(L)g (配列番号5)

ARHGAP--203--BNA~16 :5(L)T(L)5(L)aggcaactcT(L)T(L)5(L)c (配列番号6)

ARHGAP--382--BNA~16 :T(L)5(L)T(L)attgccagaT(L)T(L)5(L) t (配列番号7)

ARHGAP--406--BNA~16 :5(L)T(L)T(L) tctgattctT(L)T(L)5(L)g (配列番号8)

ARHGAP--591 –BNA~16 :5(L)5(L)5(L)gtctggcacT(L)T(L)5(L) t (配列番号9)

ARHGAP--625--BNA~16 :5(L)T(L)5(L)aaatttgaa5(L)T(L)5(L)c (配列番号10)

ARHGAP-720-BNA-1 6 :T(L)5(L)T(L)gatcccacaT(L)T(L)5(L)c (配列番号11)

ARHGAP-843-BNA-1 6 :T(L)T(L)T(L) taccccctaT(L)T(L)T(L)c (配列番号12)

ARHGAP-969-BNA-1 6 :T(L)5(L)5(L)gaaaaagcc5(L)T(L)T(L)c (配列番号13)

ARHGAP-1 006-BNA-1 6 :T(L)T(L)5(L) tttagtgctT(L)T(L)T(L)a (配列番号14)

ARHGAP-1 162-BNA-1 6 :T(L)T(L)T(L) tcctctgtg5(L)5(L)T(L)a (配列番号15)

ARHGAP-1 344-BNA-1 6 :T(L)5(L)T(L) tttcatgtc5(L)T(L)T(L) (配列番号16)

ARHGAP-1447-BNA-1 6 :T(L)5(L)5(L)aggataaaaT(L)5(L)T(L)g (配列番号17)

ARHGAP-1 538-BNA-1 6 :T(L)T(L)5(L)accaggagtT(L)T(L)5(L)a (配列番号18)

ARHGAPv1-5194-BNA-16 :T(L)5(L)T(L)aacaaccaaT(L)5(L)T(L) (配列番号33)

ARHGAPv2-2215-BNA-16 :5(L)T(L)5(L) taacagtagT(L)A(L)T(L)g (配列番号34)

ARHGAPv2-2285-BNA-16 :T(L)5(L)T(L)agaacagtaA(L)A(L)T(L) t (配列番号35)

ARHGAPv2-2306-BNA-16 :T(L)T(L)5(L)aaacatgaa5(L)T(L)T(L) t (配列番号36)

ARHGAPv2-2355-BNA-16 :T(L)5(L)5(L)caattgttgA(L)T(L)A(L)g (配列番号37)

ARHGAPv2-2404-BNA-16 :T(L)T(L)T(L) taacataagA(L)A(L)T(L)g (配列番号38)

[0051] ARHGAP-1931-BNA-16-cont1 :T(L) tT(L)gccT(L)gcaaT(L) t5(L)T(L) t (配列番号39)

ARHGAP-1931-BNA-16-cont2 :T(L) tgT(L)ccT(L)gcT(L)aat5(L)T(L) t (配列番号40)

ARHGAP-1931-BNA-16-cont3 :T(L)5(L)T(L)caatgcctgT(L)T(L)T(L) t (配列番号41)

[0052] 上記各配列からなるアンチセンスBNAをリポフエクタミン試薬を用いて各々HCT116に導入し、ARHGAP11AのmRNA発現抑制しうるアンチセンスBNAをqPCR法にて確認した。GAPDHを内部コントロールとし、GAPDHの発現量を1としたときの相対値を示した。その結果、配列番号10、13、16、17、19、21、22、30、34、35~38に示すアンチセンスBNAが、効果的にARHGAP11Aの発現を抑制していることが確認された(図11)。

[0053] (実施例6)人工核酸を含むアンチセンスBNAによるARHGAP11Aの発現抑制効果の確認

本実施例では、実施例5でARHGAP11Aの発現抑制効果を認めたアンチセンスBNAについて各種がん細胞でのARHGAP11A発現抑制効果を確認した。

アンチセンスBNAは、ARHGAP-625-BNA-16 (#625:配列番号１０)、ARHGAP-969-BNA-16 (#969:配列番号１３)、ARHGAP-1344-BNA-16 (#1344:配列番号１６)、ARHGAP-1447-BNA-16 (#1447:配列番号１７)、ARHGAP-1748-BNA-16 (#1748:配列番号１９)、ARHGAP-1931-BNA-16 (#1931:配列番号２1) 又はARHGAP-2032-BNA-16 (#2032:配列番号２２) を用いた。コントロールは配列番号４０に示すARHGAP-1931-BNA-16-cont2を用いた。また、アンチセンスBNAやコントロールとしてのオリゴヌクレオチドを加えないものを野生型 (wt) とした。がん細胞は、DLD1 (ヒト結腸腺がん細胞株)、HT29 (ヒト結腸腺がん細胞株)、Panel (ヒト膵臓腺がん細胞株)、PSN1 (ヒト膵臓腺がん) の4種類の各種がん細胞について確認した。

各々のアンチセンスBNAを実施例５に記載の方法と同手法により、リポフエクタミン試薬を用いて各がん細胞に導入し、ARHGAP11Aの発現抑制効果をウエスタンプロッティングにより確認した。

その結果、各細胞においてアンチセンスBNAによるARHGAP11Aの発現抑制が認められ、特にARHGAP-1748-BNA-16 (#1748:配列番号１９) により強い発現抑制が認められた (図１２)。

[0054] (実施例７) アンチセンスBNAの細胞内への取り込み量の確認 (in vitro)

本実施例では、FITC標識アンチセンスBNA (ARHGAP-1748-BNA-16:#1748) について、リポフエクタミン試薬を用いてHCT116内への取り込み量を確認した。コントロールとしては、実施例１で作製した配列番号４０からなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。

その結果、ARHGAP-1748-BNA-16を導入した細胞では、ARHGAP11Aの発現が抑制されることが確認された (図１３ (A))。また、ARHGAP-1748-BNA-16の細胞内取込量はコントロールと同等であった (図１３ (B))。

[0055] (実施例８) アンチセンスBNAの腫瘍細胞増殖抑制効果の確認 (in Vivo)

本実施例では、アンチセンスBNA (ARHGAP-1748-BNA-16:#1748) によるin vivoでの抗腫瘍効果を確認した。免疫不全マウス (N0D/SCID) に実施例２と同手法により、野生株のHCT116を移植したのちに、FITC標識ARHGAP-1748-BNA

-16を実施例2と同手法によりAteLoGene(R) (Koken) を用いて、腫瘍周囲に局注した。ARHGAP-1748-BNA-16の投与により、腫瘍の拡大を有意に抑制することが確認された (図14)。さらに、ARHGAP-1748-BNA-16の投与後14日目に、マウスの各臓器 (脳:brain、肝臓:liver、脾臓:spLeen、肺:Lung、腎臓:kidney, 胃:intestine) 及び腫瘍部位へのFITC標識ARHGAP-1748-BNA-16の取り込みを確認した。その結果、ARHGAP-1748-BNA-16は腫瘍部のみに到達し、その他の臓器には到達していないことが確認された (図15)。

[0056] (実施例9) アンチセンスBNAの腫瘍転移抑制効果の確認 (in vivo)

本実施例では、アンチセンスBNA (ARHGAP-1748-BNA-16:#1748) によるin vivoでの悪性腫瘍細胞の転移抑制効果を確認した。ルシフェラーゼをコードする遺伝子を含むレンチウィルスを作製し、HT1080 (ヒト線維肉腫細胞) に感染させルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ルシフェラーゼ導入細胞 (HT1080/Luc) を作製した。ヌードマウスにHT1080/Luc を5X10^{6}ceLL静脈注射した。HT1080/Luc 注射後14日間経過後に、アドリアマイシン8mg/kg 又はアンチセンスBNA10mg/kg を静脈注射した。さらに7日経過後、ルシフェリンを150mg/kg 投与し、HT1080/LUC の肺転移を発光イメージングで確認した (図16)。その結果、アドリアマイシン投与群 (n=3) よりアンチセンスBNA投与群 (n=3) の方が腫瘍は小さかった (図17)。また、肺の重量を測定した結果、各マウスについて、肺の重量はアンチセンスBNA投与群のほうがアドリアマイシン投与群に比べて軽量であった。一方、体重については両群に差を認めなかった (図18)。このことから、アンチセンスBNA投与群のほうがアドリアマイシン投与群に比べて腫瘍細胞の転移が抑制されていることが示唆された。

産業上の利用可能性

[0057] 以上詳述したように、本発明の細胞周期依存性のRhoGAPを阻害しうる物質を有効成分として含有する新規抗腫瘍剤により、細胞周期依存性のRhoGAPを発現しうるがん、具体的にはARHGAP11Aを発現しうるがん、例えば大腸がん、すい臓がん、前立腺がん細胞、乳がん、頭頸部がん、黒色腫 (メラノーマ)、卵巣がん、肺がん、脳がん、膝臓がん、肝細胞がん、腎細胞がん、皮膚が

ん等に由来するがん細胞等について、がん細胞の浸潤及び/又は転移が抑制される。従来、がん細胞の浸潤及び/又は転移を抑制しうる抗腫瘍剤で有効な薬剤はほとんど存在しなかった。がんの悪性化に影響を及ぼす、がん細胞の浸潤及び/又は転移を抑制しうる薬剤の提供により、効果的ながん治療ができ、有用である。

さらに、生体検体中の細胞周期依存性のRhoGAP、例えばARHGAP11Aの発現を、例えばmRNAにより検査した結果、がんの進行度(病期ステージ分類)や、無再発生存期間との関係で有意な違いが認められた。このことから、生体検体中の細胞周期依存性のRhoGAPを定量することで、悪性腫瘍を検査することができる。さらに、生体検体中の細胞周期依存性のRhoGAPの発現、例えばARHGAP11AのmRNA量によれば、悪性腫瘍の進行度(病期ステージ分類)や、無再発生存期間との関係で有意な違いが認められる。これにより、生体検体中の細胞周期依存性のRhoGAP、例えばARHGAP11Aの発現を測定することで、がんの進行度及び/又は予後の予測が可能と考えられ、有用である。

請求の範囲

[請求項1] 細胞周期依存性のRhoGTP分解活性タンパク質を阻害しうる物質を有効成分として含有する新規抗腫瘍剤。

[請求項2] 細胞周期依存性のRhoGTP分解活性タンパク質を阻害しうる物質が、ARHGAP1 1Aを阻害しうる物質である、請求項1に記載の新規抗腫瘍剤。

[請求項3] ARHGAP1 1Aを阻害しうる物質が、ARHGAP1 1Aをコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド又はRNA干渉を誘導するオリゴヌクレオチドであり、或いはARHGAP1 1Aをコードする遺伝子の転写産物若しくは翻訳産物に結合し得る低分子化合物、天然高分子から選択されるいずれかである請求項2に記載の新規抗腫瘍剤。

[請求項4] ARHGAP1 1Aを阻害しうる物質が、当該ARHGAP1 1Aをコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、オリゴヌクレオチドを構成する塩基が１４塩基〜２００塩基であり、当該塩基配列中に人工核酸を少なくとも１以上含むことを特徴とする請求項３に記載の新規抗腫瘍剤。

[請求項5] アンチセンスオリゴヌクレオチドが、以下の１）～１３）のいずれかに示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである、請求項４に記載の新規抗腫瘍剤：

1）ARHGAP-625-BNA-1 6 :5(L)T(L)5(L)aaatttgaa5(L)T(L)5(L)c (配列番号１０)；

２）ARHGAP-969-BNA-1 6 :T(L)5(L)5(L)gaaaaagcc5(L)T(L)T(L)c (配列番号１３)

３）ARHGAP-1 344-BNA-1 6 :T(L)5(L)T(L) tttcatgtc5(L)T(L)T(L)c (配列番号１６)；

４）ARHGAP-1447-BNA-1 6 :T(L)5(L)5(L)aggataaaaT(L)5(L)T(L)g (配列番号１７)；

５）ARHGAP-1 748-BNA-1 6 :5(L)T(L)T(L)gatggactt5(L)5(L)T(L) t (配列番号１９)

６） ARHGAP-1 931 -BNA-1 6 : T(L)T(L)T(L)gcctgcaatT(L)5(L)T(L) t （配列番号２ 1） ;

７） ARHGAP-2032-BNA-1 6 : 5(L)5(L)T(L)agattgaatT(L)T(L)5(L)a （配列番号２ ２）

８） ARHGAPv1 -3484-BNA-1 6 : T(L)T(L)5(L)gagggtaacT(L)5(L)5(L)a （配列番号３ ０） ;

９） ARHGAPv2-221 5-BNA-1 6 : 5(L)T(L)5(L) taacagtagT(L)A(L)T(L)g （配列番号３ ４） ;

１ ０） ARHGAPv2-2285-BNA-1 6 : T(L)5(L)T(L)agaacagtaA(L)A(L)T(L) t （配列番号３ ５） ;

１ １） ARHGAPv2-2306-BNA-1 6 : T(L)T(L)5(L)aaacatgaa5(L)T(L)T(L) t （配列番号３ ６） ;

１ ２） ARHGAPv2-2355-BNA-1 6 : T(L)5(L)5(L)caattgttgA(L)T(L)A(L)g （配列番号３ ７） ;

１ ３） ARHGAPv2-2404-BNA-1 6 : T(L)T(L)T(L) taacataagA(L)A(L)T(L)g （配列番号３ ８）。

[ここにおいて、N(L)は人工核酸BNA、5(I_)はL-mC （メチル化人工核酸BNA) 、τ(L)は人工核酸チミジン、A(L)は人工核酸アデニンを表す。]

[請求項6] ARHGAP1 1Aを阻害しうる物質が、RNA干渉を誘導するオリゴヌクレオチドであって、以下の１４）又は１５）に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドである、請求項３に記載の新規抗腫瘍剤 :

１ ４） ARHGAP1 1A ＃1 (TRCN0000047281) : CCGGCGGTATCAGTTCACATCGATACTCGAGTATCGATGTGAACTGATACCGTTTTTG （配列番号１） ;

１ ５） ARHGAP1 1A #2 (TRCN0000047282) : CCGGCCTTCTATTACACCTCAAGAACTCGAGTTCTTGAGGTGTAATAGAAGGTTTTTG （配列番号２）。

[請求項7] 抗腫瘍剤が、悪性腫瘍の転移阻害作用及び/ 又は浸潤阻害作用を有することを特徴とする、請求項１～ ６のいずれか１項に記載の新規抗腫瘍剤。

[請求項8] 細胞周期依存性のRhoGTP分解活性タンパク質を阻害しうる物質を選別することを特徴とする新規抗腫瘍剤のスクリーニング方法。

[請求項9] 細胞周期依存性のRhoGTP分解活性タンパク質が、ARHGAP1 1Aである、請求項８に記載のスクリーニング方法。

[請求項10] 少なくとも以下のＡ）～Ｄ）の工程を含むことを特徴とする請求項９に記載のスクリーニング方法：

Ａ）候補物質をがん細胞株と共に培養し、該細胞におけるARHGAP1 1Aをコードする遺伝子の発現量を測定する工程；

Ｂ）対照の系で同手法により測定されたARHGAP1 1Aをコードする遺伝子の発現量を測定する工程；

Ｃ）前記Ａ）及びＢ）の工程により測定されたARHGAP1 1Aをコードする遺伝子の発現量と、比較する工程；

Ｄ）Ａ）の工程により測定された遺伝子の発現量が、Ｂ）の工程により測定された遺伝子の発現量に比べて低い場合の候補物質を選別する工程。

[請求項11] 生体検体中の細胞周期依存性のRhoGTP分解活性タンパク質を定量することを特徴とする悪性腫瘍の検査方法。

[請求項12] 細胞周期依存性のRhoGTP分解活性タンパク質が、ARHGAP1 1Aである、請求項１１に記載の悪性腫瘍の検査方法。

[請求項13] 悪性腫瘍が、大腸がんやすい臓がん、前立腺がん細胞、乳がん、頭頸部がん、黒色腫(メラノーマ)、卵巣がん、肺がん、脳がん、膵臓がん、肝細胞がん、腎細胞がん、皮膚がんから選択される一種又は複数種である、請求項１１又は１２に記載の悪性腫瘍の検査方法。

[請求項14] 悪性腫瘍の検査が、がんの進行度及び/又は予後を予測するための検査である、請求項１１～１３のいずれか１項に記載の悪性腫瘍の検査方法。

[図1]

がん組織における転移/浸潤がん細胞と、細胞周期との関係
大腸がん組織における組織免疫染色 （抗Gemininﾎﾟﾘｸﾛｰﾅﾙ抗体）
non-cancer
A
cancer (central areas)
C
B
cancer (invasion head)
A
B
C

[図2]

S
S
G2
G1
S
G2
G1

G1
FITC-A
PE-A
S/G2/M

[図3]

細胞の移動足跡 （統計学的解析）

[図4]

[図5]

(A)

anti-E2F1 antibody
primer
E2F1
primer
-20kb
0
start point of transcription

(B)

ChIP assay
input
control
E2F1

[図6]

ARHGP11Aの相対的発現量
1.5
1.0
0.5
0.0
HCT116
HepG2
HLF
PSN1
MiaPaca2
Panc1
がん細胞株

[図7]

(A)

SH:ARHGAP11a 抑制
細胞増殖
relative mitotic ratio
4
3
2
1
0
cont
SH #1
SH #2

(B)

浸潤アッセイ

細胞浸潤アッセイ
cont
SH #1
SH #2
24時間後

[図8]

ARHGAP11Aを標的とした治療
ARHGAP11Aの発現を抑制するsiRNA
in vivo
siRNAを局所投与
腫瘍サイズの測定
Day-7
0
7
14
21
各n=2
(a)コントロールsiRNA群
(b)遺伝子導入試薬コントロール群
(c)コントロール群
腫瘍サイズ(mm)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
2要因の分散分析
(two-way ANOVA)
p = 0.0001
siRNA投与群
0
7
14
21
投与からの日数
生体内で腫瘍抑制効果をみとめた

[図9]

P = 0.0088
P = 0.1554
P = 0.1221
P = 0.0464
T1
T2
T3
T4
N0
N1
N2
M0
M1
I
II
III
IV
ARHGAP11Aの相対的発現

[図10]

無再発生存期間
Relapse free survival
Percent survival
100
90
80
70
60
50
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
Days
low (n=38)
high (n=26)

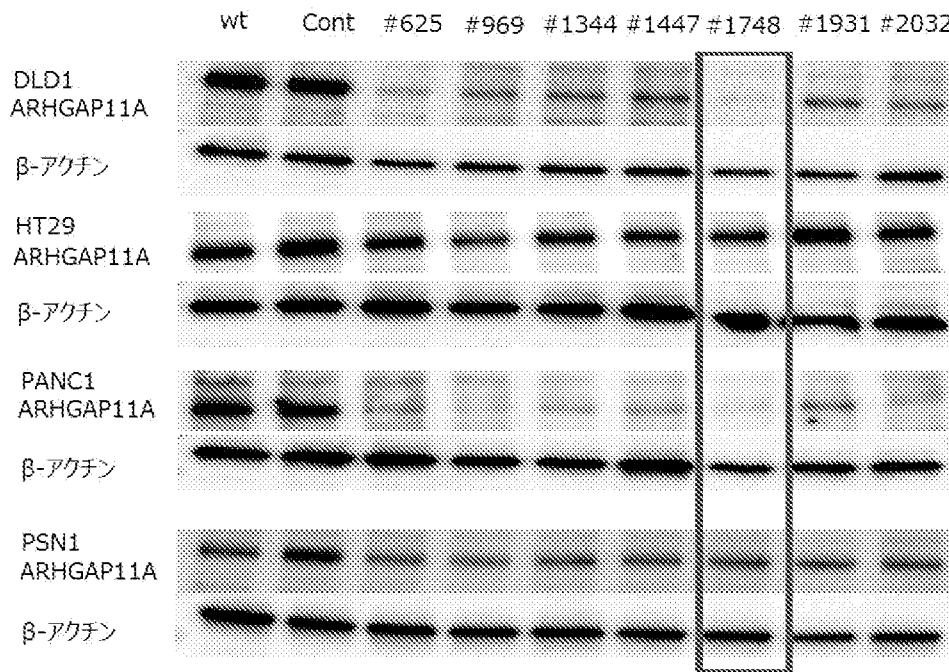
人工核酸を含む各種アンチセンスオリゴヌクレオチドによる
ARHGAP11AのmRNA発現抑制効果の確認（スクリーニング）

Relative expression of ARHGAP11A

0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50

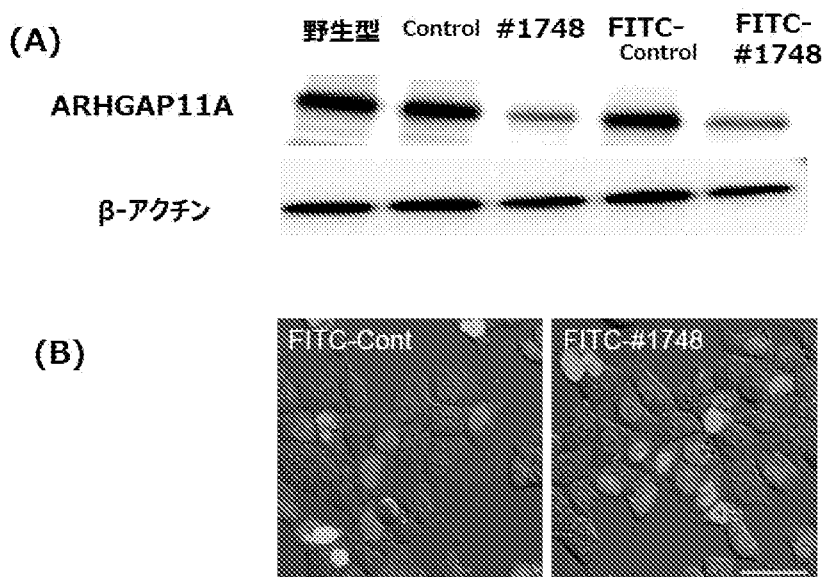
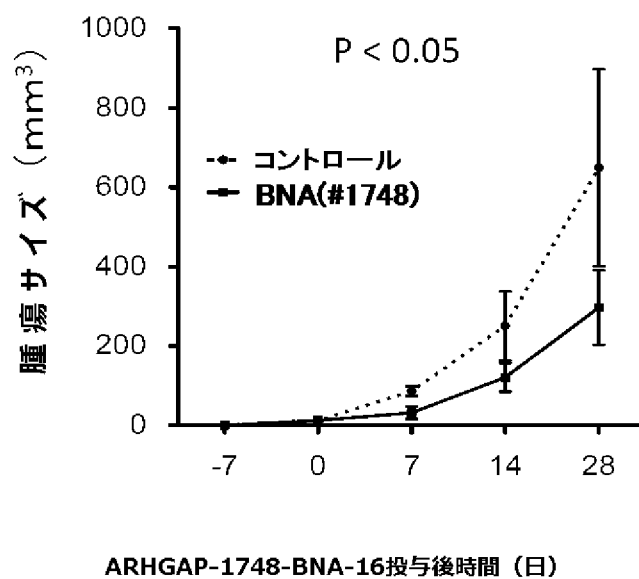
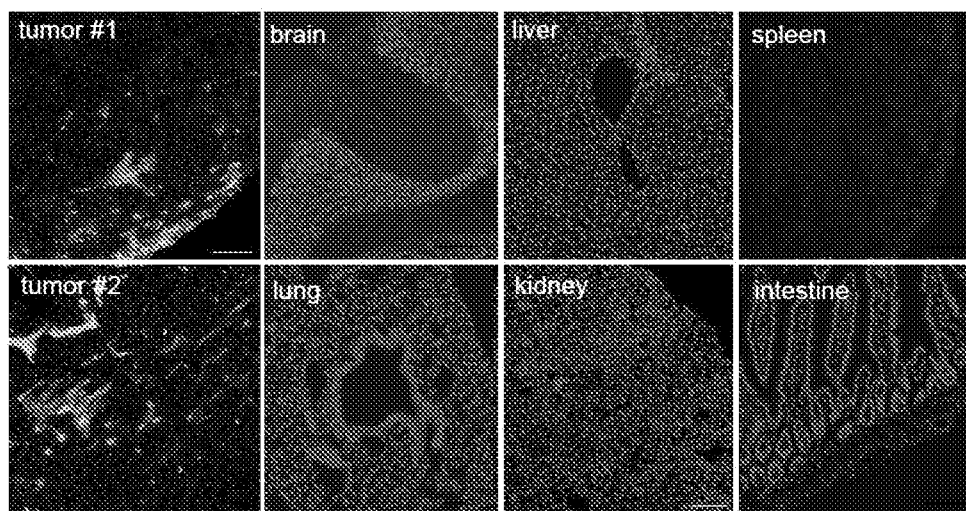
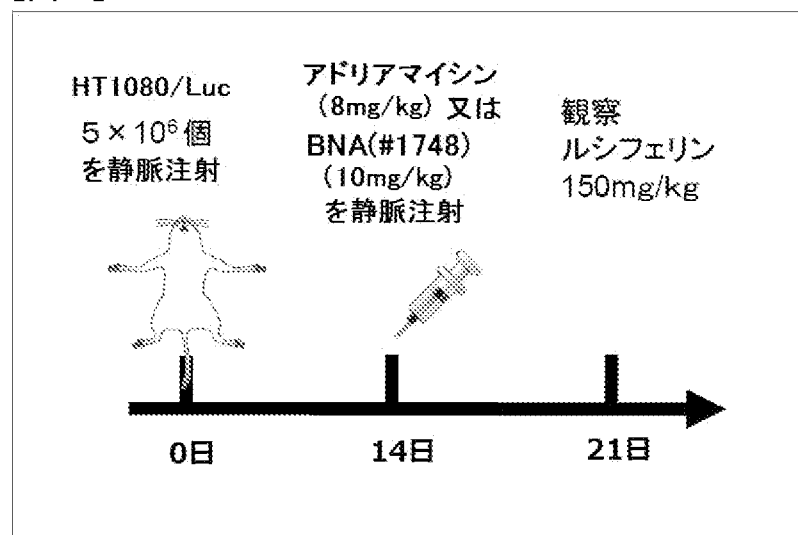
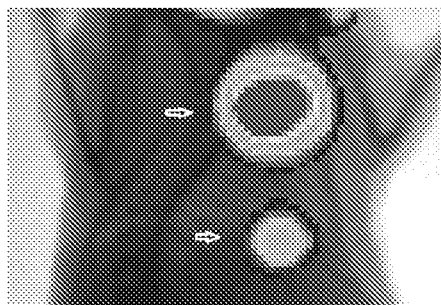
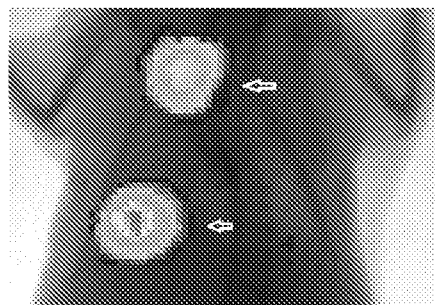
cont
siRNA-1
siRNA-2
ARHGAP-47 配列番号4
ARHGAP-126 配列番号5
AGHGAP-203 配列番号6
ARHGAP-382 配列番号7
ARHGAP-406 配列番号8
ARHGAP-591 配列番号9
ARHGAP-625 配列番号10
ARHGAP-720 配列番号11
ARHGAP-843 配列番号12
ARHGAP-969 配列番号13
ARHGAP-1006 配列番号14
ARHGAP-1162 配列番号15
ARHGAP-1344 配列番号16
ARHGAP-1447 配列番号17
ARHGAP-1538 配列番号18
ARHGAP-1748 配列番号19
ARHGAP-1849 配列番号20
ARHGAP-1931 配列番号21
ARHGAP-2032 配列番号22
ARHGAP-2176 配列番号23
ARHGAPV1-2262 配列番号24
ARHGAPV1-2311 配列番号25
ARHGAPV1-2628 配列番号26
ARHGAPV1-2808 配列番号27
ARHGAPV1-2942 配列番号28
ARHGAPV1-3278 配列番号29
ARHGAPV1-3484 配列番号30
ARHGAPV1-4399 配列番号31
ARHGAPV1-5140 配列番号32
ARHGAPV1-5194 配列番号33
ARHGAPV2-2215 配列番号34
ARHGAPV2-2285 配列番号35
ARHGAPV2-2306 配列番号36
ARHGAPV2-2355 配列番号37
ARHGAPV2-2404 配列番号38

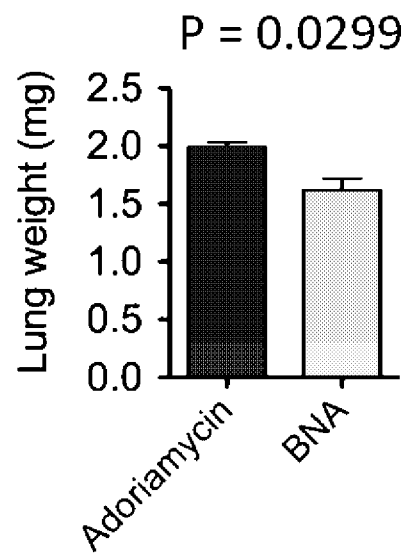
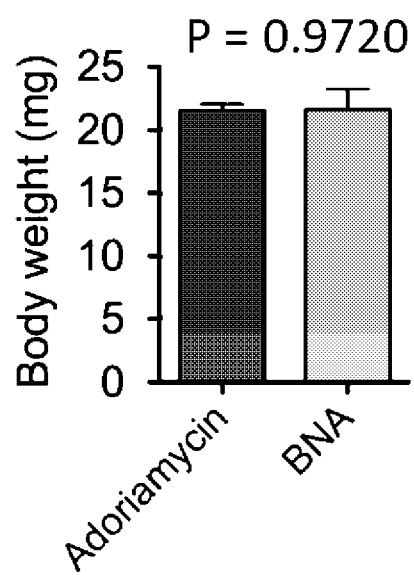
［図12］

人工核酸を含む各種アンチセンスオリゴヌクレオチドで各種癌細胞株を処理したときのARHGAP11A の発現 （ウエスタンブロッティング）

［図13］

HCT116株に人工核酸を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したときの細胞内取込

[図14]

ARHGAP-1748-BNA-16投与後時間（日）

[図15]

[図16]

[図17]

アドリアマイシン投与
8mg/kg (0.16mg/body)

BNA投与
10mg/kg (0.2mg/body)

[図18]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2013/051733

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/711(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00, A61K31/7088, A61K31/711, A61K48/00, A61P35/00, C12N15/113, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/CAplus/EMBASE/BIOSIS(STN), JST Plus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), REGISTRY(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	Toshiyuki KUSAMA et al., "PI90 RhoGTPase RhoGTPase Sogai o Oyo shita Sui Gan Saibo no Ten'i Shinjun Yokusei ni Kansuru Kento", Seijinbyo, 2007, vol.47, no.3, pages 9 to 10, summary, page 9, left column, page 10, left column, 2nd paragraph	1,7/2-4, 8-10/5,6
Y/A	Besson, A., et al., Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors?, Nature Reviews Cancer, 2004, Vol. 4, No.2, pp.948-955, page 950, left column, 1st to 2nd paragraphs, Box1	1-4,7-10/5,6

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibnion or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying tiie invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 February, 2013 (25.02.13)	05 March, 2013 (05.03.13)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japanese Patent Office	
Facsimile No.	Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 11A (ARHGAP I IA), transcript variant 1, mRNA, DATABASE NCBI Nucleotide [online] accession No.丽_014783, 2011.11.27 URL<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/197333716?sat=15&satkey=6322659>	1-4,7-10/5,6
Y/A	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 11A (ARHGAP I IA), transcript variant 2, mRNA, DATABASE NCBI Nucleotide [online] accession No.丽_199357, 2011.11.19 URL<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/40788017?sat=15&satkey=6242735>	1-4,7-10/5,6
X/A	WO 2008/111464 AI (Eisai R & D Management Co., Ltd.), 18 September 2008 (18.09.2008), paragraphs [0008] to [0023]; page 64 & US 2010/0021918 AI & EP 2136209 AI paragraphs [0008] to [0023]; page 64	8-10/1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/051733

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [×] Claims Nos.: 11-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/051733

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

The inventions in claims 11 to 14 include inventions, wherein "a medical doctor" diagnoses a disease on the basis of obtained information, without stating about the inevitable judgment of the presence or absence of the disease using a specific examination step or judgment criteria or a step for forecasting the extent of the progress and prognosis of the disease. Therefore, these inventions pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and, therefore, relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

Claims 1 to 3 relate to "a novel antitumor agent" which comprises, as the active ingredient, a compound defined by a desired property "a substance capable of inhibiting a protein with RhoGTPase activity".

Although these claims include any compounds having the above property, only an antisense oligonucleotide to a gene encoding ARHGAP11A and an shRNA are exclusively disclosed under the provision of Article 5 of the PCT. Therefore, it appears that these claims are not supported by the description under the provision of Article 6 of the PCT.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it cannot be recognized that the scope of compounds having the above property as "a substance capable of inhibiting a protein with RhoGTPase activity" could be specified. Thus, claims 1 to 3 also fail to satisfy the requirement of clearness as defined in Article 6 of the PCT.

Such being the case, the search was conducted exclusively on the relationship between "a protein with RhoGTPase activity" or "ARHGAP11A" and "an antitumor agent" and the antitumor agents which comprise, as the active ingredient, the compounds that are particularly stated in the description and specified in claims 5 and 6-

国際調査報告

国際出願番号　PCT/JP2013/051733

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K45/00 (2006.01)i, A61K31/7088 (2006.01)i, A61K31/711 (2006.01)i, A61K48/00 (2006.01)i, A61P35/00 (2006.01)i, C12N15/113 (2010.01)i, C12Q1/68 (2006.01)i, G01N33/15 (2006.01)i, G01N33/50 (2006.01)i, G01N33/574 (2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/7088, A61K31/711, A61K48/00, A61P35/00, C12N15/113, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922－1996年
日本国公開実用新案公報	1971－2013年
日本国実用新案登録公報	1996－2013年
日本国登録実用新案公報	1994－2013年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE/CAplus/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), REGISTRY (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X/ Y/ A	草間俊行 他，P190 RhoGTP による RhoGTPase 阻害を応用した膵がん細胞の転移浸潤抑制に関する検討，成人病，2007，Vol. 47, No. 3, pp. 9-10 要旨、第9頁左欄、第10頁左欄第2段落	1, 7/ 2-4, 8-10/ 5, 6
Y/ A	Besson, A., et al., Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK innibitors?, Nature Reviews Cancer, 2004, Vol. 4, No. 2, pp. 948-955 第950頁左欄第1-2段落、BoxI	1-4, 7-10/ 5, 6

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　25.02.2013

国際調査報告の発送日　05.03.2013

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ISA/JP）
郵便番号100－8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）　4C　3962
佐々木　大輔
電話番号　03-3581-1101　内線　3452

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/ A	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 11A (ARHGAPIIA), transcript variant 1, raRNA, DATABASE NCBI Nucleotide [online] accession No. NM_014783, 2011. 11. 27 URL<http t/www, ncbi.nlm, nih.gov/nuccore/197333716? sat=15&sat kev-6322659>	1-4, 7-10/ 5, 6
Y/ A	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 11A (ARHGAPIIA), transcript variant 2, raRNA, DATABASE NCBI Nucleotide [online] accession No. 丽—199357, 2011. 11. 19 URL<http t/www, ricbi.nlm, nih.gov/ nuccore/ 40788017?sat=15&.satk ey=6242735>	1-4, 7-10/ 5, 6
X/ A	wo 2008/111464 AI (エーザイ・アール・アンド・ディー'マネジメント株式会社) 2008. 09. 18, 段落【0008】一段落【0023】、第64頁 & US 2010/0021918 AI & EP 2136209 AI 段落【0008】一段落【0023】、第64頁	8-10/ 1-7

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　１１－１４　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項１１－１４に係る発明は、特定の検査工程や判定基準等により必然的に該疾患の有無を判定する記載や病気の進行度・予後を予測する工程等の記載がなく、「医師」が得られた情報から病気を判断する発明を含んでいるから、ヒトの診断方法に関するものであって、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　　　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　　　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつたが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項1－3は、「RhoGTP 分解活性タンパク質を阻害しうる物質」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする 新規抗腫瘍剤」に関するものである。そして、該請求項は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT 第5条の意味において開示されているのは、ARHGAP11A をコードする遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド又は shRNA のみであり、PCT 第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「RhoGTP 分解活性タンパク質を阻害しうる物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求項1－3は、PCT 第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は 「RhoGTP 分解活性タンパク質」又は 「ARHGAP11A 」と 抗腫瘍剤」との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求項5、6に特定されている化合物を有効成分とする抗腫瘍剤について行った。